

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/14215  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. März 2000 (16.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05453	(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1999 (30.07.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 40 737.8 7. September 1998 (07.09.98) DE 198 45 251.9 1. Oktober 1998 (01.10.98) DE	<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN [DE/DE]; Universitätsklinikum, Geissweg 3, D-72076 Tübingen (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): SCHLÜSENER, Hermann, J. [DE/DE]; Hausser Strasse 15, D-72076 Tübingen (DE). DÜRR, Daniel [DE/DE]; Charlottenstrasse 8/108, D-72070 Tübingen (DE).		
(74) Anwälte: WITTE, Alexander usw.; Rotebühlstrasse 121, D-70178 Stuttgart (DE).		
(54) Title: METHOD FOR SELECTING PEPTIDES FOR THE TARGETED TRANSPORT OF DRUGS AND MARKERS, AND PEPTIDES DISCOVERED USING SAID METHOD		
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SELEKTION VON PEPTIDEN FÜR ZIELGERICHTETEN PHARMA- UND MARKERTRANSPORT UND PEPTIDE DAMIT ENTDECKT		
(57) Abstract		
<p>The present invention relates to a method for selecting peptides for the targeted transport of drugs and markers. According to this method, a bacteriophage library is applied to an animal and a target structure is prepared outside the animal after incubation. The selected bacteriophages are isolated from the target structure and are applied to another animal after adequate amplification during a new cycle. This invention further relates to peptides selected according to the present method, wherein said peptides penetrate into the intestine mucosa, bind to the endothelial cells of tumors and inflammatory injury and are translocated into the tumor.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Es wird ein Verfahren zur Selektion von Peptiden für zielgerichteten Pharmaka- und/oder Markertransport beschrieben, bei dem eine Phagendisplay-Bibliothek einem Tier appliziert und eine bestimmte Zielstruktur nach Inkubation aus dem Tier präpariert wird. Aus der Zielstruktur werden selektierte Phagen isoliert, die nach entsprechender Amplifikation in einer neuen Runde einem weiteren Tier appliziert werden. Mit dem Verfahren selektierte Peptide, die die Darmmukosa penetrieren und an Endothelzellen von Tumoren und entzündlichen Läsionen binden sowie in den Tumor transloziert werden, sind ebenfalls offenbart.</p>		

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**VERFAHREN ZUR SELEKTION VON PEPTIDEN FÜR ZIELGERICHTETEN PHARMA-  
UND MARKERTRANSPORT UND PEPTIDE DAMIT ENTDECKT**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von Peptiden für zielgerichteten Pharmaka- und/oder Markertransport sowie mit dem Verfahren selektierte Peptide und deren Verwendung.

In den letzten Jahren hat das sogenannte Pharmatargeting zunehmend an Bedeutung gewonnen. Unter Pharmatargeting wird allgemein der selektive Transport von Therapeutika und/oder Diagnostika, im folgenden übergreifend mit "Pharmaka" bezeichnet, zu einem zu therapiierenden oder diagnostisch zu erfassenden

Zielgewebe, -organ etc., im folgenden mit "Zielstruktur" bezeichnet, im menschlichen oder tierischen Körper verstanden.

Durch den zielgerichteten Einsatz von Pharmaka erhofft sich die Fachwelt vor allem eine Reduzierung der Dosierung sowie eine drastische Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen, da die Pharmaka durch das sogenannte "Targeting" überwiegend der Zielstruktur zugeführt werden, so daß Beeinträchtigungen des restlichen Organismus weitgehend vermieden werden können. Duncan, "Drug Targeting: Where Are We Now and Where Are We Going?", Journal of Drug Targeting, 1997, Band 5, Nr. 1, Seiten 1-4 gibt einen kurzen Überblick über die zugrunde liegende Technologie sowie bereits auf dem Markt befindliche Produkte, zu denen Antitumor-Antikörper, Polymer-Konjugate sowie liposomale Transportsysteme zählen. Langer beschreibt in "Drug Delivery and Targeting", Nature 1998, Band 392/SUPP, Seiten 5-10 die Möglichkeit, pharmazeutische Agenzien in einem Polymer oder Lipid einzukapseln oder daran zu koppeln, um neue Therapien zu ermöglichen sowie die Sicherheit und Wirksamkeit der Pharmaka zu erhöhen. Die wirtschaftliche Bedeutung des Pharmatargeting lässt sich daran ermessen, daß bis zu 15 % aller Krankenhausaufenthalte, einige hunderttausend Tote sowie mehr als einhundert Milliarden US-Dollar Kosten des Gesundheitssystems in den USA jedes Jahr auf Arzneimittelnebenwirkungen zurückzuführen sind (Langer, a.a.O.).

Auch in der Gentherapie wird der zielgerichtete Einsatz von Agenzien, hier von DNA-Segmenten tragenden Vektoren für in vivo Anwendung diskutiert. In diesem Zusammenhang wird unter "gene targeting" die Verwendung der homologen Rekombination verstanden, um definierte Änderungen an dem Genom vorzunehmen, d.h.

eine genaue Korrektur genetischer Defekte; siehe Yáñez and Porter, "Therapeutic Gene Targeting", Gene Therapy, 1998, Band 5, Seiten 149-159.

Ein vielversprechender Ansatz für zielgerichtete Transportsysteme für Krebs-Therapeutika wird in kurzen Peptiden gesehen, an die die Therapeutika gekoppelt sind und die spezifisch an angiogene Endothelzellen binden; siehe Barinaga, "Peptide-Guided Cancer Drugs Show Promise in Mice", SCIENCE, 1998, Band 279, Seiten 323-324. Die kurzen Peptide der Konjugate sollen dabei an die den Tumor versorgenden Blutgefäße binden, so daß die Pharmaka die die Tumore versorgenden Endothelzellen abtöten können.

Die experimentelle Entwicklung von Strategien zur Synthese von derartigen chimären Peptiden, insbesondere zur Bereitstellung der spezifischen Peptide, nimmt in der wissenschaftlichen Literatur einen immer größer werdenden Raum ein. Ein Ansatz besteht darin, ein Phagensystem zu verwenden, bei dem durch genetische Verfahren auf der Oberfläche der Phagen Zufallspeptide präsentiert werden, deren Bindung an Zielstrukturen zur Selektion des Phagens und damit der Peptid-kodierenden DNA-Sequenz genutzt werden. Der M13-Phage hat sich als geeignet für derartige "Phagendisplay-Bibliotheken" erwiesen, um z.B. DNA-bindende Proteine mit neuen Eigenschaften sowie Proteinstrukturen mit Bindungs- und Katalyse-eigenschaften zu entwickeln; siehe O'Neil and Hoess "Phage Display: Protein Engineering by Directed Evolution", Current Opinion in Structural Biology, 1995, Band 5, Seiten 443-449.

Barry et al., "Toward Cell-Targeting Gene Therapy Vectors: Selection of Cell-Binding Peptides from Random Peptide-Presenting Phage Libraries", NATURE MEDICINE, Band 2, Nr. 3, Seiten 299-305 beschreiben ein Verfahren zur Erzeugung von zielsuchenden Liganden für Gentherapie-Vektoren, bei dem Peptid-präsentierende Phagenbibliotheken eingesetzt werden, um Peptide zu selektieren, die an bestimmte Zelltypen binden und von diesen internalisiert werden. Scott and Smith, "Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library", SCIENCE, 1990, Band 249, Seiten 386-390 beschreiben die Verwendung einer Bibliothek von Phagenklonen, von denen jeder eine Peptidsequenz auf der Viron-Oberfläche zeigt, zur Selektion von mimetischen Peptiden, die agonistisch, antagonistisch oder modulierend wirken sollen.

Derartige Phagendisplay-Bibliotheken sind z.B. von NEW ENGLAND BioLabs Inc. kommerziell erhältlich. Ein Verfahren zum schnellen Testen von Peptidliganden mit einer Phagendisplay-Peptidbibliothek ist in dem Manual Ph.D.-7™ Phage Display Peptide Library Kit von NEW ENGLAND BioLabs Inc. beschrieben. Diese auf dem M13 Phagen basierende Bibliothek erlaubt die Selektion enorm diverser Bibliotheken von Peptiden im Hinblick auf bestimmte Bindungseigenschaften durch einen "Biopanning" genannten *in vitro* Selektionsprozeß.

Der insoweit diskutierte Stand der Technik beschreibt Verfahren zur *in vitro* Selektion von an Zielstrukturen bindenden Peptiden, um diese Peptide für die Synthese von Chimären oder selbst als funktionale Agenzien zu nutzen.

Bei all diesen Verfahren ist von Nachteil, daß die *in vitro* gefundenen funktionalen und/oder Bindungseigenschaften der

selektionierten Peptide bei der in vivo Anwendung durch z.B. den Metabolismus beeinträchtigt werden, so daß die aus diesen Peptiden hergestellten Chimären nicht die erforderliche Selektivität aufweisen.

Pasqualini and Ruoslahti, "Organ Targeting in vivo Using Phage Display Peptide Libraries", NATURE 1996, Band 380, Seiten 364-366 beschreiben ein in vivo Verfahren zur Selektion von zielgerichteten Peptiden mit Hilfe von Phagendisplay-Bibliotheken. Sie injizierten die Phagensuspension in Form einer Lösung mit  $10^{14}$  bzw.  $10^{16}$  Phagen intravenös in Mäuse und präparierten nach einer Inkubationszeit von ein bis vier Minuten verschiedene Organe, aus denen sie die gebundenen Phagen isolierten. Dieser Selektionsprozeß wurde mehrfach wiederholt und führte zu Phagenpopulationen, die organotrope Peptide präsentieren, die z.B. selektiv an die Blut-Hirnschranke binden sollen. Einige Organe, wie z.B. Leber und Lunge, banden dabei zu viele Phagen, um als Zielorgan für die Selektion eingesetzt zu werden, so daß Pasqualini und Ruoslahti sich auf Peptidsequenzen beschränken mußten, die eine Phagenbindung an Hirn und Niere bewirkten, da diese Organe relativ wenige Phagen aus den unselektierten Bibliotheken banden. Die Autoren schlagen vor, die selektionierten Peptide zur Herstellung von Pharmakakonjugaten oder Liposomen mit zielsuchenden Eigenschaften zu verwenden. Als interessante zukünftige Zielstruktur wird die Tumorvasculatur genannt, die eine aktive Angiogenese erfährt und spezifische Marker enthält. Es wird spekuliert, daß es hierdurch möglich werden kann, Therapien direkt in die Tumore zu richten und andere Gewebe zu schonen.

Nach Kenntnis der Erfinder der vorliegenden Anmeldung sind selektive Behandlungs- oder Imagingverfahren, also Verfahren, bei denen insbesondere pathologisch veränderte Zielstrukturen *in vivo* zielgerichtet behandelt oder visualisiert werden, nicht in der Anwendung. Die bisherigen Verfahren haben den Nachteil mangelnder Selektivität und verstärkte Nebenwirkungen bedingende hoher Dosierungen.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren der eingangs genannten Art zu schaffen, das eine effiziente Selektion derartiger Peptide ermöglicht, sowie Peptide der eingangs genannten Art bereitzustellen.

Bei dem eingangs genannten Verfahren wird diese Aufgabe gelöst durch die Schritte:

- a) Bereitstellen einer Bibliothek unterschiedlicher Peptide in einer Startlösung,
- b) Applizieren der Startlösung in ein Tier, vorzugsweise eine Ratte,
- c) Inkubation des so präparierten Tieres für eine bestimmte Zeitspanne,
- d) Präparation einer Zielstruktur aus dem Tier,
- e) Isolation von Peptiden aus der präparierten Zielstruktur,
- f) Amplifikation der isolierten Peptide,

- g) zumindest einmaliges Wiederholen der obigen Schritte b) bis f) mit den amplifizierten, isolierten Peptiden aus Schritt f), sowie
- h) Charakterisierung der im Schritt e) isolierten Peptide.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst. Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nämlich erkannt, daß Phagendisplay-Bibliotheken auch in vivo eingesetzt werden können, um Peptide zu selektieren, die an pathologisch veränderte Zielstrukturen, Endothelzellen von Tumoren sowie entzündlichen Läsionen, insbesondere autoimmunen Entzündungen des Nervensystems beim Menschen binden, so daß im Tiermodell selektierte Peptide Kandidaten für entsprechende therapeutische und/oder diagnostische Zubereitungen nicht nur für die Tiermedizin sondern auch für die Humanmedizin sind.

Als überraschendes Ergebnis hat sich herausgestellt, daß die selektierten Peptide nicht nur an die Endothelschichten binden, sondern diese auch penetrieren, so daß sie dazu geeignet sind, zum Transport von Pharmaka direkt z.B. in den Tumor eingesetzt zu werden.

In diesem Zusammenhang war weiter überraschend, daß die Phagen-suspension auch oral, vorzugsweise über eine Magensonde appliziert werden kann, wobei Phagen mit den selektierten Peptiden aus dem Blutspeicher Milz präpariert werden konnten. Die Oberflächenproteine dieser Phagen können damit für die Entwicklung von oral zu applizierenden Arzneimitteln für die Nutztier-medizin verwendet werden.

Die Peptide ermöglichen eine Verbesserung des Transportes von Pharmaka über die Mukosaschranke des Gastrointestinalbereiches und damit eine erwünschte Dosisreduzierung. Dies erlaubt auch einen besseren Transport von Antigenen für eine völlig neue Art der Immunmodulation, also der Veränderung der Immunantwort im Sinne einer Immunstimulation oder Immunsuppression. Insbesondere bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen und bei Transplantationspatienten können derartige Peptide mit angekoppelten Agentien zur Induzierung der peripheren Toleranz verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich in diesem Zusammenhang dadurch aus, daß die Startlösung oral, ggf. über eine Magensonde appliziert wird und/oder als Zielstruktur pathologisch veränderte Zielstrukturen ausgewählt werden und/oder die Zeitspanne der Inkubation größer als eine Stunde ist und/oder die Bibliothek unterschiedlicher Peptide eine Phagendisplay-Bibliothek ist, von der in der Startlösung weniger als  $10^{14}$ , vorzugsweise ca.  $10^{12}$ , Peptide präsentierende Phagen enthalten sind. Statt einer Phagendisplay-Bibliothek ist auch eine humane Lymphknoten-Phagomidbibliothek einsetzbar.

Überraschend ist zum einen die Möglichkeit der oralen Applikation, es war nicht zu erwarten, daß die Phagensuspension im Milieu des Gastrointestinalbereiches einsetzbar ist, wobei weiter überraschend war, daß die kurzen Peptidbereiche auf der Oberfläche der Phagen die Penetration des gesamten Phagen durch die Darmmukosaschicht vermitteln konnten.

Ein besonderer Vorteil ist durch die gegenüber dem Stand der Technik deutlich vergrößerte Inkubationszeit ggf. im Zusammenhang mit der verringerten Zahl von Phagen in der Startlösung zu

sehen, weil hierdurch eine bessere Selektion von Phagen möglich wurde, so daß sogar Endothelschichten penetrierende Phagen gefunden werden konnten.

Besonders überraschend ist das Ergebnis, wonach im Rattenmodell selektionierte Peptide, die zielgerichtet gegen Endothelzellen pathologisch veränderter Strukturen gerichtet sind, auch an entsprechende humane Strukturen binden. Damit sind die Ergebnisse des Tiermodells überraschenderweise unmittelbar auf den Menschen anwendbar.

Wegen der hohen Spezifität der selektionierten Peptide lassen sich diese darüber hinaus nicht nur in therapeutischen sondern auch in diagnostischen Zubereitungen verwenden, mit denen z.B. pathologische Endothelentzündungen bereits im Anfangsstadium visualisiert werden können. Die Auswirkungen auf eine frühzeitige Diagnostik liegen auf der Hand. Bei Patienten mit Verdacht auf Entzündungen kann mit Hilfe von die selektionierten Peptide sowie daran gekoppelte Marker enthaltenden pharmazeutischen Zubereitungen der Entzündungsherd sehr frühzeitig lokalisiert werden, so daß geeignete therapeutische Maßnahmen ergriffen werden können.

Insgesamt sind die im Rattenmodell gefundenen Peptide Kandidaten für mögliche Steuer- oder Transportpeptide beim Menschen. Es konnte gezeigt werden, daß einige der selektionierten Phagen nicht nur an das Endothel binden sondern sich perivaskulär im Tumor befinden, so daß sie für den Pharmakatransport an die angiogenetische Endothelzelle und in den Tumor hinein verwendet werden können. Besonders vorteilhaft ist dabei die hohe Spezifität, denn die selektionierten Peptide/Phagen binden nicht an

normales Hirnendothel, wohl aber an Endothel subkutaner Tumore sowie an Kryoschnitte humaner Glioblastome.

Für den Pharmakatransport ist ferner von Vorteil, daß Phagen, die an pathologisches Tumorendothel binden, auch an Endothel entzündlicher Läsionen binden und ins Hirnparenchym transloziert werden.

Gegenstand der Erfindung sind damit auch nach dem Verfahren selektierte Peptide gemäß beigefügter Sequenzliste, wobei die Peptide SEQ-ID No. 1-11 eine Penetration der Darmmukosa vermittelten und die Peptide SEQ-ID No. 12-90 an pathologisch veränderte humane Zielstrukturen binden und in diese transloziert werden.

Die Peptidfragmente SEQ-ID No. 1-90 können Teil eines größeren Peptides sein, dessen Bindung oder Penetration sie vermitteln. Vor diesem Hintergrund betrifft die Erfindung ferner ein Peptid, das zumindest ein Peptidfragment mit einer der Peptidsequenzen SEQ-ID No. 1-90 enthält. Es ist denkbar, daß durch einen Aminosäureaustausch, Verlängerung, Substitution, Insertion und/oder Deletion die erfindungsgemäßen Peptide in der Sequenz verändert werden, jedoch noch immer funktionell vergleichbar sind sowie vorzugsweise an das gleiche Epitop binden, so daß auch derart veränderte Peptidsequenzen von der Erfindung umfaßt sind.

Die kommerzielle Produktion der selektierten Peptide wird in der Regel auf gentechnischem Wege erfolgen, so daß die Erfindung ferner einen Vektor mit zumindest einer für eines der Peptide SEQ-ID No. 1-90 kodierenden DNA-Sequenz betrifft.

Da die selektionierten Peptide für den zielgerichteten Transport therapeutischer und/oder diagnostischer Agenzien verwendet werden können, betrifft die Erfindung ferner die Verwendung derartiger Peptide zur Herstellung eines Arzneimittels, das ein an das Peptid gekoppeltes Therapeutikum und/oder Diagnostikum aufweist.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines derartigen Peptides zur Herstellung einer diagnostischen Zubereitung für die Visualisierung pathologischer Endothelentzündungen.

Es versteht sich, daß die vorstehend erwähnten Merkmale nicht nur in der angegebenen Kombination, sondern auch einzeln oder in anderer Kombination verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die Erfindung wird nachstehend anhand von Beispielen erläutert, aus denen sich weitere Merkmale und Vorteile ergeben.

Zusätzlich zu der Sequenzliste im 1. Letter Code ist noch ein übliches Sequenzprotokoll beigefügt, wobei die Sequenzen in der Sequenzliste bei Abweichungen zum Sequenzprotokoll vorrangig sind.

Beispiel 1: Phagendisplay-Bibliothek

Die benutzte Phagenbibliothek stammte von der Firma NEW ENGLAND BioLabs Inc. und enthielt je 1 ml  $10^{12}$  M13mp19-Phagen. Die generelle Handhabung dieser Heptapeptid-Bibliothek ist beschrieben in Ph.D.-7™ Phage Display Peptide Library Kit. Die Biblio-

theke zeigt Random-Peptide innerhalb des Gen III Proteins mit 3 bis 5 Kopien pro Phagenpartikel.

Als Wirtsbakterium diente E.coli ER2537, der für die Propagation von M13-Phagen gut geeignet ist und ebenfalls von NEW ENGLAND BioLabs bezogen wurde.

Die Pagenbibliothek wurde mittels einer ER2537-Übernachtkultur amplifiziert.

Beispiel 2: Medien und Lösungen

**TBS für M13-Phagen:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl

**LB-Medium:** 20 g LB (siehe unten), 1 l deionisiertes Wasser

**Top-Agar M13:** 2 g LB (1 g Bakterientrypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl), 1 g Agarose, 100 ml destilliertes Wasser, autoklavieren und bei + 4°C aufbewahren

**Grund-Agar M13:** 2 g LB (siehe oben), 1,2 g AgarAgar, 100 ml Wasser

**10 x SM:** 5,8 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 50 ml 1 M Tris x Cl (pH 7,5), 5 ml 2 % BSA, Auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 1.000 ml

SM ist die Pufferlösung für die Dialyse von Phagen und schafft ein die Phagen gut konservierendes Ionenmilieu.

Beispiel 3: Applikation, Inkubation und Präparation

Die in SM gelösten und gereinigten Phagen werden mittels einer 1 ml-Spritze über eine Magensonde einer Lewis-Ratte in den Magen appliziert, die in einem Alter von 6-8 Wochen für die Versuche verwendet wird. Die Ratte wird hierzu kurz mit Äther narkotisiert.

Nach einer Inkubationszeit von 2-6 Stunden wird die Ratte erneut narkotisiert und mit PBS perfundiert. Daraufhin wird die Milz entnommen und in ca. 2 ml LB-Medium homogenisiert.

Beispiel 4: M13-Reinigung

Das Organhomogenat aus Beispiel 3 wird zu einer frischen ER2537 Bakterienkultur mit einer OD<sub>600</sub> von mindestens 0,6 gegeben und 4 1/2 Stunden bei 37°C und 95 rpm inkubiert. Es folgen die Schritte:

Zentrifugation des Lysates für 30 min mit 4.000 rpm bei 4°C.

Mischen von 80 % des Überstandes mit 1/6 Vol 20 % Polyethylen-glykol/2,5 M NaCl.

Präzipitieren der Phagen für wenigstens 2 Stunden bei 4°C.

Sedimentation des Präzipitates für 60 min mit 4.000 rpm bei 4°C.

Lösen des Sedimentes mit Überstand und nochmalige Zentrifugation für 30 min mit 4.000 rpm bei 4°C.

Antrocknen des Sedimentes und Lösen in 2 ml TBS.

Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm, um störende Partikel zu sedimentieren.

Aufnahme des Überstandes in 200 µl 10 x SM.

Lagerung dieser Phagen-Lösung bei +4°C zum Sequenzieren oder für einen weiteren Durchgang, beginnend oben bei Beispiel 3.

Beispiel 5: Titerbestimmung von Phagenkulturen

Der Titer der einzelnen Phagenkulturen aus Beispiel 4 wird mit einem üblichen Plaque Essay über eine Verdünnungsreihe bestimmt.

Die selektionierten Phagen werden mit der PCR-Technik auf übliche Weise sequenziert und aus der bestimmten Sequenz das Oberflächenprotein abgeleitet, das die Penetration des gesamten Phagen durch die Darmmukosa vermittelt hat.

Die selektionierten Peptide sind in der Sequenzliste unter SEQ-ID No. 1-11 aufgeführt.

Beispiel 6: Neurotumore/Entzündungen des Nervensystems

Um Peptide zu selektieren, die zielgerichtet an Tumorenendothel oder Entzündungsendothel binden, werden Ratten mit den experimentellen Autoimmunerkrankungen Enzephalomyelitis (EAE), Neuritis (EAN) oder Uveitis (EAU) eingesetzt, denen die ursprüngliche oder in der vorhergehenden Runde selektierte Phagenbibliothek injiziert wird.

Als Zielgewebe wird Glioblastom, Gliosarkom bzw. neurales Gewebe mit autoimmunen Entzündungen präpariert und die gebundenen Phagen isoliert und amplifiziert, wie oben beschrieben. Die Inkubationszeit beträgt ca. 72 Stunden.

Präparation, Isolation und Amplifikation sowie Charakterisierung der Peptide bzw. Phagen erfolgen wie oben unter Beispiel 3 bis 5 beschrieben.

Die so im Tiermodell selektierten Peptide/Phagen wurden dann immunhistologisch untersucht.

Die in der Sequenzliste als SEQ-ID No. 12-27 und 46-90 aufgeführten Peptide banden dabei nicht nur an das Endothel, sondern fanden sich auch perivasculär im Tumor. Sie können damit nicht nur zum Transport von Pharmaka an die angiogenetische Endothelzelle sondern auch zum Transport direkt in den Tumor eingesetzt werden.

Die Phagen binden jedoch nicht an normales Hirnendothel, wohl aber an Endothel subkutaner Tumore sowie an Kryoschnitte humarer Glioblastome.

Beispiel 7: Einsatz einer Lymphknoten-Bibliothek

Statt der Phagendisplay-Bibliothek aus Beispiel 6 wird eine humane Lymphknoten-Phagemidbibliothek (EZI net™ phage display cDNA Library; > 2 x 10<sup>6</sup> cfu; Maxim Biotech, San Francisco, CA, U.S.A.) verwendet, die durch Random-Priming hergestellt wurde und eine Insert-Größe von 0,3 bis 3,0 kB aufweist. Die wie in Beispiel 6 gefundenen und die dort beschriebenen Eigenschaften aufweisenden Phagemidsequenzen sind in der Sequenzliste als SEQ-ID No. 28-45 aufgeführt.

Beispiel 8: Anwendungsfälle

Neben der "Zielsuche" nach festen Tumoren sowie bei akuten und chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen finden die erfindungsgemäßen Peptidsequenzen SEQ-ID No. 1-90 sowie deren an das gleiche Epitop bindenden Varianten Einsatzfelder bei der Beobachtung von allergischen Reaktionen, Gewebeumbau bei Arteriosklerose, Hypertonie und Restenose nach Gefäßwiederherstellung, Transplantatabstoßungen, immunentzündlichen Reaktionen auf Implantate, Brandwunden, Schock bei Hyperplasien sowie benignen Neoplasien oder dem Fortschreiten von Präneoplastischen Läsionen.

Die mukosa-gängigen Perfidsequenzen SEQ-ID No. 1-11 können zur Verbesserung oraler Vakzine, insbesondere auch aus transgenen Pflanzen verwendet werden.

Sequenzliste (1-Letter-Code)

SEQ-ID No. 1	Y P R L L T P
SEQ-ID No. 2	W P Y P P A G
SEQ-ID No. 3	Y T P P S V S
SEQ-ID No. 4	A H L K A S I
SEQ-ID No. 5	T H F P S W N
SEQ-ID No. 6	S N L S P R T
SEQ-ID No. 7	A V F V K E L
SEQ-ID No. 8	L P T P W R P
SEQ-ID No. 9	A G I A L A F
SEQ-ID No. 10	G S P H V E H
SEQ-ID No. 11	S K L E S H A
SEQ-ID No. 12	N I P Y N P Y
SEQ-ID No. 13	V L A S P L N
SEQ-ID No. 14	N L G L E T S
SEQ-ID No. 15	G N S L S F P
SEQ-ID No. 16	I R T P S T V
SEQ-ID No. 17	E L V K I F S
SEQ-ID No. 18	V A V T D S R
SEQ-ID No. 19	A I S P R T F
SEQ-ID No. 20	N I S Y N A Y
SEQ-ID No. 21	D A T R L S S
SEQ-ID No. 22	T H V H M L S
SEQ-ID No. 23	H P T K W P L
SEQ-ID No. 24	S L P P K T T
SEQ-ID No. 25	A H E H T Y A
SEQ-ID No. 26	V G N N N Y P
SEQ-ID No. 27	D H L H S S R

SEQ-ID No. 28	P P T V K R K M N P T R G S T R E F R T	R A Q S T A A D H R G T C R R
SEQ-ID No. 29	N T T H Y R G C A A S Q S R R C K T T A E L	R R L S W V T P G F S E L Y L G D T I E
SEQ-ID No. 30	T E L E F R V F Y X	V X V T
SEQ-ID No. 31	T K R E N A E C V K	L Q R D P
SEQ-ID No. 32	P V N C I	
SEQ-ID No. 33	P P P R P S R T A R	S W G T W R
SEQ-ID No. 34	T G P E F P G R P T	R P V L D R E R P L
SEQ-ID No. 35	T G P E F P G R P T	R P V L D R E R P L
SEQ-ID No. 36	T S F P Y S E S Y	
SEQ-ID No. 37	T E L E F R V F Y S	V T
SEQ-ID No. 38	T V L Q Y L G R V V	
SEQ-ID No. 39	T G P E F P G R P T	R P L
SEQ-ID No. 40	T G P E F P G R P T	R P K K T C F
SEQ-ID No. 41	T P G P R S H W D Q I P Q L A G S R G C E E A S S R C K K S V L R A L E S R R Q	H R L A C F F W F G W S H S N L P Q S C S R R W E G L S P L L A
SEQ-ID No. 42	P T M G V K F F T L A V P L W T N S	S T R F F P S V Q R
SEQ-ID No. 43	P P P R P S R T A R	S W G T W R
SEQ-ID No. 44	P P F F F F F F L E	Q Q H R H F I S F H
SEQ-ID No. 45	T S Y I V F P C F S	
SEQ-ID No. 46	F K S P S T L L H A	P L
SEQ-ID No. 47	H P T A L S K K A D	P F

SEQ-ID No. 48	G I T S S P Q K V W	A S
SEQ-ID No. 49	Q A H R T G W L N S	V V
SEQ-ID No. 50	T E L S A I P S D S	S N
SEQ-ID No. 51	H S T F L P G Y R P	P P
SEQ-ID No. 52	N L P H L S H R P Y	G L
SEQ-ID No. 53	H Y E E P A P F L G	Y S
SEQ-ID No. 54	Q M T V D D K M P F	T R
SEQ-ID No. 55	H S H H N N R A L W	H R
SEQ-ID No. 56	H P S L Y P P R N M	P A
SEQ-ID No. 57	S S K S L T M N Y L	S S
SEQ-ID No. 58	Q S L D P G A S W F	S L
SEQ-ID No. 59	A Y T S H F S G R H	S P
SEQ-ID No. 60	A P A H S R H T A T	L S
SEQ-ID No. 61	S L T T L K V A G A	G P
SEQ-ID No. 62	S P T T N W P T H N	W V
SEQ-ID No. 63	S M G G H G T S M P	S A
SEQ-ID No. 64	T H P S K A Q L P A	S H
SEQ-ID No. 65	T L H T P P P R M S	I R
SEQ-ID No. 66	D H P M M R I Y	
SEQ-ID No. 67	S Q T P G S H P R I	
SEQ-ID No. 68	S L T K T H P W Q Y	Y S
SEQ-ID No. 69	S I G Q S L I Q R V	T G

SEQ-ID No. 70	H Q S P I H F A T K	N S
SEQ-ID No. 71	K T N M M Y M A A W	S M
SEQ-ID No. 72	A P L S A N S D V I	S R
SEQ-ID No. 73	Y T N G Y I T	
SEQ-ID No. 74	F P S T A L H R H P	G P
SEQ-ID No. 75	S N D T H G V H G L	I Q
SEQ-ID No. 76	T Q Q A L L H T A F	S H
SEQ-ID No. 77	V L N K S H A A P T	F P
SEQ-ID No. 78	L A S S T P	
SEQ-ID No. 79	T P T L N N S G T H	P W
SEQ-ID No. 80	W S G M A L E Q R H	M K
SEQ-ID No. 81	F N D M E G R H F L	G R
SEQ-ID No. 82	S A N T P D H P T Q	F Y
SEQ-ID No. 83	S V S H S S V K L S	P F
SEQ-ID No. 84	Y K S P P S Q I T H	T V
SEQ-ID No. 85	S P S N E F R E P S	L G
SEQ-ID No. 86	H F P Q G T L V L F	K P
SEQ-ID No. 87	L W A Y E N P P N N	R Y
SEQ-ID No. 88	D P H L S L V P T T	P P
SEQ-ID No. 89	S S T D P Q P R P I	Y T
SEQ-ID No. 90	T L P A P I M S P P	K M

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von Peptiden für zielgerichteten Pharmaka- und/oder Markertransport, mit den Schritten:
  - a) Bereitstellen einer Bibliothek unterschiedlicher Peptide in einer Startlösung,
  - b) Applizieren der Startlösung in ein Tier, vorzugsweise eine Ratte,
  - c) Inkubation des so präparierten Tieres für eine bestimmte Zeitspanne,
  - d) Präparation einer Zielstruktur aus dem Tier,
  - e) Isolation von Peptiden aus der präparierten Zielstruktur,
  - f) Amplifikation der isolierten Peptide,
  - g) zumindest einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f) mit den amplifizierten, isolierten Peptiden aus Schritt f), sowie
  - h) Charakterisierung der im Schritt e) isolierten Peptide.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeitspanne im Schritt c) größer als eine Stunde, vorzugsweise größer als zwei Stunden ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt b) die Startlösung dem Tier oral, vorzugsweise über eine Magensonde appliziert wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt a) eine Phagendisplay-Bibliothek bereitgestellt wird und im Schritt b) in der Startlösung weniger als  $10^{14}$ , vorzugsweise ca.  $10^{12}$  aktive Phagen appliziert werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt d) ein pathologisch verändertes Zielgewebe des Tieres präpariert wird.
6. Peptid, das zumindest ein Peptidfragment mit einer der Peptidsequenzen SEQ-ID No. 1-90 aus der Sequenzliste enthält.
7. Peptid mit einer Aminosäure-Sequenz gemäß einer der Sequenzen SEQ-ID No. 1-90 aus der Sequenzliste.
8. Peptid mit einer Aminosäure-Sequenz gemäß Anspruch 6 oder 7, wobei zumindest eine der Aminosäuren ersetzt ist durch eine strukturell und/oder funktionell vergleichbare Aminosäure.

9. Peptid mit einer Aminosäure-Sequenz, die unter Beibehaltung der Funktion durch Verlängerung, Substitution, Insertion und/oder Deletion aus einem Peptid gemäß Anspruch 6 oder 7 hervorgegangen ist.
10. Peptid, das an das gleiche Epitop bindet wie ein Peptid gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9.
11. Vektor mit zumindest einer für ein Peptid mit einer Peptidsequenz gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10 kodierenden DNA-Sequenz.
12. Verwendung eines nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 selektierten Peptides, insbesondere eines Peptides gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10 zur Herstellung eines Arzneimittels, das ein an das Peptid gekoppeltes Therapeutikum aufweist.
13. Verwendung eines nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 selektierten Peptides, insbesondere eines Peptides gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10 zur Herstellung eines Arzneimittels, das ein an das Peptid gekoppeltes Diagnostikum aufweist.
14. Verwendung eines nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 selektierten Peptides, insbesondere eines Peptides gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10 zur Herstellung einer diagnostischen Zubereitung für die Visualisierung pathologischer Endothelentzündungen.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Eberhard-Karls-Universitaet Tuebingen

<120> Peptide fuer Pharmatargeting

<130> 5402P162WO

<140>

<141>

<150> DE 198 45 251.9

<151> 1998-10-01

<150> DE 198 40 737.8

<151> 1998-09-07

<160> 90

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 1

Tyr Pro Arg Leu Leu Thr Pro

1

5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 2

Trp Pro Tyr Pro Pro Ala Gly

1

5

<210> 3  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 3  
Tyr Thr Pro Pro Ser Val Ser  
1 5

<210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 4  
Ala His Leu Lys Ala Ser Ile  
1 5

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 5  
Thr His Phe Pro Ser Trp Asn  
1 5

<210> 6  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 6

Ser Asn Leu Ser Pro Arg Thr

1

5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 7

Ala Val Phe Val Lys Glu Leu

1

5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 8

Leu Pro Thr Pro Trp Arg Pro

1

5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 9

Ala Gly Ile Ala Leu Ala Phe

1

5

<210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 10  
Gly Ser Pro His Val Glu His  
1 5

<210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 11  
Ser Lys Leu Glu Ser His Ala  
1 5

<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 12  
Asn Ile Pro Tyr Asn Pro Tyr  
1 5

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 13

Val Leu Ala Ser Pro Leu Asn

1

5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 14

Asn Leu Gly Leu Glu Thr Ser

1

5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 15

Gly Asn Ser Leu Ser Phe Pro

1

5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 16

Ile Arg Thr Pro Ser Thr Val

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 17

Glu Leu Val Lys Ile Phe Ser

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 18

Val Ala Val Thr Asp Ser Arg

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 19

Ala Ile Ser Pro Arg Thr Phe

1 5

<210> 20

<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 20  
Asn Ile Ser Tyr Asn Ala Tyr  
1 5

<210> 21  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 21  
Asp Ala Thr Arg Leu Ser Ser  
1 5

<210> 22  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 22  
Thr His Val His Met Leu Ser  
1 5

<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 23

His Pro Thr Lys Trp Pro Leu

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 24

Ser Leu Pro Pro Lys Thr Thr

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 25

Ala His Glu His Thr Tyr Ala

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 26

Val Gly Asn Asn Asn Tyr Pro

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 27

Asp His Leu His Ser Ser Arg

1 5

<210> 28

<211> 35

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 28

Pro Pro Thr Val Lys Arg Lys Met Asn Pro Arg Ala Gln Ser Thr Ala

1 5 10 15

Ala Asp His Arg Thr Arg Gly Ser Thr Arg Glu Phe Arg Thr Gly Thr

20 25 30

Cys Arg Arg

35

<210> 29

<211> 42

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 29

Asn Thr Thr His Tyr Arg Gly Cys Ala Ala Arg Arg Leu Ser Trp Val

1 5 10 15

Thr Pro Gly Phe Ser Gln Ser Arg Arg Cys Lys Thr Thr Ala Ser Glu  
20 25 30

Leu Tyr Leu Gly Asp Thr Ile Glu Glu Leu  
35 40

<210> 30  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 30  
Thr Glu Leu Glu Phe Arg Val Phe Tyr Xaa Val Xaa Val Thr  
1 5 10

<210> 31  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 31  
Thr Lys Arg Glu Asn Ala Glu Cys Val Lys Leu Gln Arg Asp Pro  
1 5 10 15

<210> 32  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 32  
Pro Val Asn Cys Ile  
1 5

<210> 33  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 33  
Pro Pro Pro Arg Pro Ser Arg Thr Ala Arg Ser Trp Gly Thr Trp Arg  
1 5 10 15

<210> 34  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 34  
Thr Gly Pro Glu Phe Pro Gly Arg Pro Thr Arg Pro Val Leu Asp Arg  
1 5 10 15

Glu Arg Pro Leu  
20

<210> 35  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 35  
Thr Gly Pro Glu Phe Pro Gly Arg Pro Thr Arg Pro Val Leu Asp Arg  
1 5 10 15

Glu Arg Pro Leu  
20

<210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 36  
Thr Ser Phe Pro Tyr Ser Glu Ser Tyr  
1 5

<210> 37  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 37  
Thr Glu Leu Glu Phe Arg Val Phe Tyr Ser Val Thr  
1 5 10

<210> 38  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 38  
Thr Val Leu Gln Tyr Leu Gly Arg Val Val  
1 5 10

<210> 39  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 39

Thr Gly Pro Glu Phe Pro Gly Arg Pro Thr Arg Pro Leu  
1 5 10

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 40

Thr Gly Pro Glu Phe Pro Gly Arg Pro Thr Arg Pro Lys Lys Thr Cys  
1 5 10 15

Phe

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 41

Thr Pro Gly Pro Arg Ser His Trp Asp Gln His Arg Leu Ala Cys Phe  
1 5 10 15Phe Trp Phe Gly Ile Pro Gln Leu Ala Gly Ser Arg Gly Cys Trp Ser  
20 25 30His Ser Asn Leu Pro Gln Ser Cys Glu Glu Ala Ser Ser Arg Cys Lys  
35 40 45

Lys Ser Ser Arg Arg Trp Glu Gly Leu Ser Pro Leu Val Leu Arg Ala

50

55

60

Leu Glu Ser Arg Arg Gln Leu Ala  
65                   70

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 42

Pro Thr Met Gly Val Lys Phe Phe Thr Leu Ser Thr Arg Phe Phe Pro  
1               5                   10                   15

Ser Val Gln Arg Ala Val Pro Leu Trp Thr Asn Ser  
20                   25

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 43

Pro Pro Pro Arg Pro Ser Arg Thr Ala Arg Ser Trp Gly Thr Trp Arg  
1               5                   10                   15

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 44

Pro Pro Phe Phe Phe Phe Phe Leu Glu Gln Gln His Arg His Phe

15

1

5

10

15

Ile Ser Phe His

20

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 45

Thr Ser Tyr Ile Val Phe Pro Cys Phe Ser

1

5

10

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 46

Phe Lys Ser Pro Ser Thr Leu Leu His Ala Pro Leu

1

5

10

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 47

His Pro Thr Ala Leu Ser Lys Lys Ala Asp Pro Phe

1

5

10

<210> 48  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 48  
Gly Ile Thr Ser Ser Pro Gln Lys Val Trp Ala Ser  
1 5 10

<210> 49  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 49  
Gln Ala His Arg Thr Gly Trp Leu Asn Ser Val Val  
1 5 10

<210> 50  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 50  
Thr Glu Leu Ser Ala Ile Pro Ser Asp Ser Ser Asn  
1 5 10

<210> 51  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 51

His Ser Thr Phe Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Pro Pro  
1 5 10

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 52

Asn Leu Pro His Leu Ser His Arg Pro Tyr Gly Leu  
1 5 10

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 53

His Tyr Glu Glu Pro Ala Pro Phe Leu Gly Tyr Ser  
1 5 10

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 54

Gln Met Thr Val Asp Asp Lys Met Pro Phe Thr Arg  
1 5 10

<210> 55  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 55  
His Ser His His Asn Asn Arg Ala Leu Trp His Arg  
1 5 10

<210> 56  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 56  
His Pro Ser Leu Tyr Pro Pro Arg Asn Met Pro Ala  
1 5 10

<210> 57  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 57  
Ser Ser Lys Ser Leu Thr Met Asn Tyr Leu Ser Ser  
1 5 10

<210> 58  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 58

Gln Ser Leu Asp Pro Gly Ala Ser Trp Phe Ser Leu

1               5               10

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 59

Ala Tyr Thr Ser His Phe Ser Gly Arg His Ser Pro

1               5               10

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 60

Ala Pro Ala His Ser Arg His Thr Ala Thr Leu Ser

1               5               10

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 61  
Ser Leu Thr Thr Leu Lys Val Ala Gly Ala Gly Pro  
1 5 10

<210> 62  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 62  
Ser Pro Thr Thr Asn Trp Pro Thr His Asn Trp Val  
1 5 10

<210> 63  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 63  
Ser Met Gly Gly His Gly Thr Ser Met Pro Ser Ala  
1 5 10

<210> 64  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 64  
Thr His Pro Ser Lys Ala Gln Leu Pro Ala Ser His  
1 5 10

<210> 65

<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 65  
Thr Leu His Thr Pro Pro Pro Arg Met Ser Ile Arg  
1 5 10

<210> 66  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 66  
Asp His Pro Met Met Arg Ile Tyr  
1 5

<210> 67  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 67  
Ser Gln Thr Pro Gly Ser His Pro Arg Ile  
1 5 10

<210> 68  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus

**einer Phagendisplay-Bibliothek**

&lt;400&gt; 68

Ser Leu Thr Lys Thr His Pro Trp Gln Tyr Tyr Ser

1

5

10

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 69

Ser Ile Gly Gln Ser Leu Ile Gln Arg Val Thr Gly

1

5

10

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 70

His Gln Ser Pro Ile His Phe Ala Thr Lys Asn Ser

1

5

10

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 71

Lys Thr Asn Met Met Tyr Met Ala Ala Trp Ser Met

1

5

10

<210> 72  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 72  
Ala Pro Leu Ser Ala Asn Ser Asp Val Ile Ser Arg  
1 5 10

<210> 73  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 73  
Tyr Thr Asn Gly Tyr Ile Thr  
1 5

<210> 74  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 74  
Phe Pro Ser Thr Ala Leu His Arg His Pro Gly Pro  
1 5 10

<210> 75  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 75

Ser Asn Asp Thr His Gly Val His Gly Leu Ile Gln  
1 5 10

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 76

Thr Gln Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Phe Ser His  
1 5 10

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 77

Val Leu Asn Lys Ser His Ala Ala Pro Thr Phe Pro  
1 5 10

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

&lt;400&gt; 78

Leu Ala Ser Ser Thr Pro

1 5

<210> 79  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 79  
Thr Pro Thr Leu Asn Asn Ser Gly Thr His Pro Trp  
1 5 10

<210> 80  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 80  
Trp Ser Gly Met Ala Leu Glu Gln Arg His Met Lys  
1 5 10

<210> 81  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 81  
Phe Asn Asp Met Glu Gly Arg His Phe Leu Gly Arg  
1 5 10

<210> 82  
<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 82

Ser Ala Asn Thr Pro Asp His Pro Thr Gln Phe Tyr

1 5 10

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 83

Ser Val Ser His Ser Ser Val Lys Leu Ser Pro Phe

1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 84

Tyr Lys Ser Pro Pro Ser Gln Ile Thr His Thr Val

1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 85

Ser Pro Ser Asn Glu Phe Arg Glu Pro Ser Leu Gly

1

5

10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 86

His Phe Pro Gln Gly Thr Leu Val Leu Phe Lys Pro

1

5

10

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 87

Leu Trp Ala Tyr Glu Asn Pro Pro Asn Asn Arg Tyr

1

5

10

<210> 88

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 88

Asp Pro His Leu Ser Leu Val Pro Thr Thr Pro Pro

1

5

10

<210> 89  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 89  
Ser Ser Thr Asp Pro Gln Pro Arg Pro Ile Tyr Thr  
1 5 10

<210> 90  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
einer Phagendisplay-Bibliothek

<400> 90  
Thr Leu Pro Ala Pro Ile Met Ser Pro Pro Lys Met  
1 5 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 99/05453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C12N15/10	A61K38/04	G01N33/68	C07K07/06	C07K07/08
	C07K14/00	G01N33/50			

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 22972 A (PHARMACIA & UPJOHN) 26 June 1997 (1997-06-26) the whole document ---	1-5
X	WO 98 34110 A (PHARMACIA & UPJOHN) 6 August 1998 (1998-08-06) the whole document ---	1-5
X	EP 0 773 441 A (LA JOLLA CANCER RESEARCH FOUNDATION) 14 May 1997 (1997-05-14) the whole document ---	1-5
X	WO 94 26787 A (LELAND STANFORD UNIVERSITY) 24 November 1994 (1994-11-24) the whole document ---	1-5
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 January 2000

Date of mailing of the International search report

31/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05453

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 17614 A (ELAN & CYTOGEN) 15 May 1997 (1997-05-15) claim 13 -----	1-5

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 99/05453

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 6, 8-14 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 99/05453

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

**1. Claims Nos. 1-5**

Method for selecting peptides for the targeted transport of drugs and/or markers.

**2. Claims Nos. 6-14**

Peptides detected by utilizing the method of Claims Nos. 1-5, and the use of said peptides.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No

PCT/EP 99/05453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9722972 A	26-06-1997	AU EP	1127097 A 0880703 A	14-07-1997 02-12-1998
WO 9834110 A	06-08-1998	AU ZA	5887998 A 9800795 A	25-08-1998 05-08-1998
EP 773441 A	14-05-1997	US AU AU AU CA DE EP JP WO	5622699 A 6374098 A 693723 B 6973996 A 2204535 A 773441 T 0876611 A 10502674 T 9710507 A	22-04-1997 18-06-1998 02-07-1998 01-04-1997 20-03-1997 04-03-1999 11-11-1998 10-03-1998 20-03-1997
WO 9426787 A	24-11-1994	NONE		
WO 9717614 A	15-05-1997	IE AU AU AU CA CA EP EP WO NZ NZ	80466 B 705816 B 7585296 A 705688 B 7585396 A 2234685 A 2235226 A 0859959 A 0876615 A 9717613 A 322174 A 322175 A	29-07-1998 03-06-1999 29-05-1997 27-05-1999 29-05-1997 15-05-1997 15-05-1997 26-08-1998 11-11-1998 15-05-1997 25-02-1999 25-02-1999

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05453

A.	KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES				
IPK 7	C12N15/10	A61K38/04	G01N33/68	C07K07/06	C07K07/08
	C07K14/00		G01N33/50		

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K G01N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 22972 A (PHARMACIA & UPJOHN) 26. Juni 1997 (1997-06-26) das ganze Dokument	1-5
X	WO 98 34110 A (PHARMACIA & UPJOHN) 6. August 1998 (1998-08-06) das ganze Dokument	1-5
X	EP 0 773 441 A (LA JOLLA CANCER RESEARCH FOUNDATION) 14. Mai 1997 (1997-05-14) das ganze Dokument	1-5
X	WO 94 26787 A (LELAND STANFORD UNIVERSITY) 24. November 1994 (1994-11-24) das ganze Dokument	1-5
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussetzung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25. Januar 2000

31/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05453

**C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 17614 A (ELAN & CYTOGEN) 15. Mai 1997 (1997-05-15) Anspruch 13 -----	1-5

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/ 05453

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr. 6, 8-14 weil sie sich auf Teile der internationale Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
  
3.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält

siehe Zusatzblatt

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-5

Verfahren zur Selektion von Peptiden für Zielgerichteten Pharmaka- und/oder Markertransport.

2. Ansprüche: 6-14

Durch die Verwendung des Verfahrens der Ansprüche 1-5 entdeckte Peptide und deren Verwendungen

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05453

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9722972 A	26-06-1997	AU EP	1127097 A 0880703 A	14-07-1997 02-12-1998
WO 9834110 A	06-08-1998	AU ZA	5887998 A 9800795 A	25-08-1998 05-08-1998
EP 773441 A	14-05-1997	US AU AU AU CA DE EP JP WO	5622699 A 6374098 A 693723 B 6973996 A 2204535 A 773441 T 0876611 A 10502674 T 9710507 A	22-04-1997 18-06-1998 02-07-1998 01-04-1997 20-03-1997 04-03-1999 11-11-1998 10-03-1998 20-03-1997
WO 9426787 A	24-11-1994	KEINE		
WO 9717614 A	15-05-1997	IE AU AU AU AU CA CA EP EP WO NZ NZ	80466 B 705816 B 7585296 A 705688 B 7585396 A 2234685 A 2235226 A 0859959 A 0876615 A 9717613 A 322174 A 322175 A	29-07-1998 03-06-1999 29-05-1997 27-05-1999 29-05-1997 15-05-1997 15-05-1997 26-08-1998 11-11-1998 15-05-1997 25-02-1999 25-02-1999